

## **EXHIBIT 5**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : <b>C07D 493/22, A61K 31/365 // (C07D 493/22, 307:00, 307:00, 307:00, 307:00)</b>		(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/52911</b>
A1		(43) Date de publication internationale: 21 octobre 1999 (21.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00794 (22) Date de dépôt international: 6 avril 1999 (06.04.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/04585 10 avril 1998 (10.04.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PIETRI, Sylvia [FR/FR]; 18, allée Léo Delibes, Tour de Vallier, F-13500 Martigues (FR). FINET, Jean-Pierre [FR/FR]; Mas les Oivades, Chemin de Boussicaud, F-13280 Raphèle les Arles (FR). LIEBGOTT, Thibaud [FR/FR]; 14, rue Lautard, F-13003 Marseille (FR). CULCASI, Marcel [FR/FR]; Vallon du Pauvre Homme, Allée de la Marjolaine, F-13500 Martigues (FR). HENRIET, Christiane [BE/FR]; Chemin de l'Ecole, Moulin de Redon, F-13390 Aurioc (FR). (74) Mandataire: MONCHENY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: GINKGOLIDE DERIVATIVES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM (54) Titre: DERIVES DE GINKGOLIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT (57) Abstract <p>The invention concerns firstly a compound of general formula (I) wherein: R<sub>1</sub> represents a hydrogen atom or an hydroxyl group; R<sub>2</sub> represents a C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> aromatic group comprising, if required, one or several heteroatoms selected among oxygen, nitrogen, sulphur and optionally substituted by one or several groups selected among: halogen atoms such as fluorine, chlorine, bromine or iodine; hydroxyl, linear or branched C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alkyl, linear or branched C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alkoxy, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alkenyl groups; (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X group with n representing an integer between 0 and 5 and X representing a group selected among: NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> with R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> representing independently of each other a hydrogen atom, a C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alkyl group or a phenyl group; the groups CN, CHO, CF<sub>3</sub>, SR<sub>5</sub> with R<sub>5</sub> representing a hydrogen atom, a C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl group or a phenyl; a group OR<sub>6</sub> with R<sub>6</sub> corresponding to the definition of R<sub>5</sub> or representing a P(O)(OR<sub>7</sub>)(OR<sub>8</sub>) group with R<sub>7</sub> and R<sub>8</sub> representing independently of each other a hydrogen atom or a C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alkyl group.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour premier objet un composé de formule générale (I) dans laquelle: R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle, R<sub>2</sub> représente un groupement aromatique en C<sub>3</sub> à C<sub>12</sub> comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les: atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode; groupements hydroxyle, alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, alkoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, alcényle en C<sub>2</sub> à C<sub>6</sub>; groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi: NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> avec R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> ou un groupement phényle; les groupements CN, CHO, CF<sub>3</sub>, SR<sub>5</sub> avec R<sub>5</sub> représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub> ou un phényle, et un groupement OR<sub>6</sub> avec R<sub>6</sub> répondant à la définition de R<sub>5</sub> ou représentant un groupement P(O)(OR<sub>7</sub>)(OR<sub>8</sub>) avec R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub>.</p>		

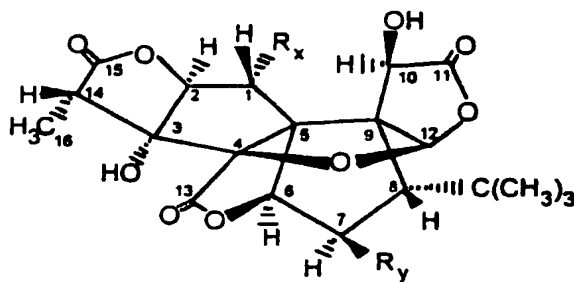
"Dérivés de ginkgolides, leur procédé de préparation et compositions pharmaceutiques les contenant".

La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés ginkgolides utiles notamment pour leurs propriétés cardioprotectrices.

L'extrait de feuille de *Ginkgo biloba*, plus particulièrement désigné sous l'appellation EGb 761, est un mélange complexe dont l'intérêt thérapeutique a aujourd'hui été démontré notamment dans le domaine cardiovasculaire. L'EGb 761 est particulièrement efficace pour le traitement des insuffisances vasculaires (S. PIETRI et al., Cardiovascular Drugs and Therapy (1997), 11 ; 121-131), cérébrales et périphériques, des syndromes hypoxiques ou ischémiques, et des lésions cérébrales induites par le vieillissement (F.V. De FEUDIS, in *Ginkgo Biloba Extract, from chemistry to the clinic*, Ed. J.-P. PRINZ ; Wiesbaden Ullstein Medical, 1998).

Parmi les substances constituant l'EGb 761 sont considérés comme les agents les plus actifs en terme pharmacologique, les flavonoïdes, dont principalement les glycosides flavonols, présents jusqu'à environ 24 % dans l'extrait et les terpènes dont plus particulièrement les ginkgolides et le bilobalide correspondant à environ 6 % de la teneur de l'extrait EGb 761.

En ce qui concerne plus particulièrement les ginkgolides, il s'agit d'un mélange des ginkgolides A, B, C et J répondant à la formule générale suivante :



ginkgolide	Rx	Ry
A	H	H
B	OH	H
C	OH	OH
J	H	OH

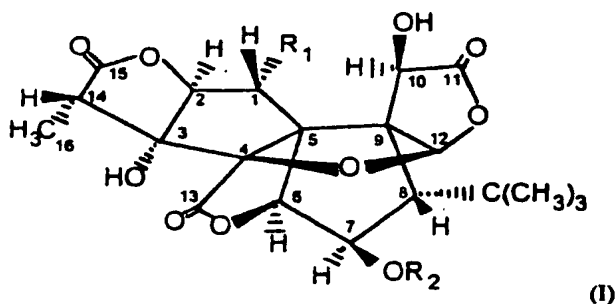
Récemment, il a été montré que la perfusion des ginkgolides A et B, à faibles doses, et plus particulièrement celle du ginkgolide A, inhibait significativement la formation des radicaux libres oxygénés qui sont généralement produits au cours de l'ischémie/reperfusion myocardique et améliorait la récupération fonctionnelle cardiaque (S. Pietri et al., J. Mol. Cell. Cardiol 29, 733-742 (1997)).

Ces composés manifestent donc un intérêt thérapeutique potentiel qu'il serait particulièrement avantageux d'optimiser en terme d'efficacité en augmentant leur activité cardioprotectrice et/ou en facilitant leur pénétration au sein des cellules à traiter.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux dérivés ginkgolides, apparentés aux ginkgolides naturels précités et qui soient plus performants en terme d'efficacité.

15 De manière inattendue, les inventeurs ont mis en évidence qu'en fonctionnalisant des ginkgolides en position 7, il était possible d'accroître leur faculté à pénétrer dans les cellules et/ou d'augmenter leur activité cardioprotectrice.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un  
20 composé de formule générale I



**dans laquelle :**

- 25      - R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
- R<sub>2</sub> représente un groupement aromatique en C<sub>5</sub> à C<sub>12</sub> comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi

l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :

- atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- groupements hydroxyle, alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié,
- 5 — alkoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, alcényle en C<sub>2</sub> à C<sub>6</sub>,
- groupements (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi :
  - NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> avec R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> ou un groupement phényle,
  - 10 - les groupements CN, CHO, CF<sub>3</sub>, SR<sub>5</sub> avec R<sub>5</sub> représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> ou un phényle et
  - un groupement OR<sub>6</sub> avec R<sub>6</sub> répondant à la définition de R<sub>5</sub> ou représentant un groupement P(O)(OR<sub>7</sub>)(OR<sub>8</sub>) avec R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub>.

20 De préférence, l'invention concerne les composés de formule générale (I) dans laquelle R<sub>2</sub> représente un groupement phényle, 1- ou 2-naphtyle ou biphényle, substitués comme indiqué ci-dessus.

Plus préférentiellement, il s'agit de composés dans lesquels R<sub>2</sub> 25 représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>5</sub> linéaire ou ramifié ou un groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sub>6</sub> avec n étant un entier variant de 1 à 5 et R<sub>6</sub> représentant un groupement P(O)(OR<sub>7</sub>)(OR<sub>8</sub>) dans lequel R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un 30 groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub>.

Selon un mode préféré de l'invention, le groupement R<sub>1</sub> représente dans les composés de formule générale I un groupement hydroxyle.

A titre illustratif des composés selon l'invention on peut tout particulièrement citer le 1,3,10-trihydroxy-7-(4-méthylphénoxy) ginkgolide encore dénommé 7-O-(p-tolyl)ginkgolide C, dont la préparation est décrite en exemple 2 ci-après.

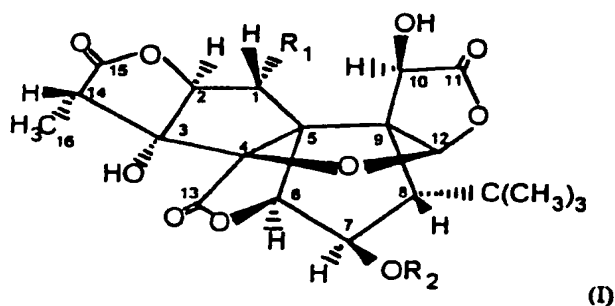
5

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un composé de formule générale I tel que défini ci-dessus.

Le procédé plus particulièrement retenu dans le cadre de la présente invention pour préparer les composés revendiqués met en œuvre une  
10 arylation à l'aide d'un réactif du bismuth pentavalent. Il s'agit plus particulièrement du diacétate de triarylbismuth.

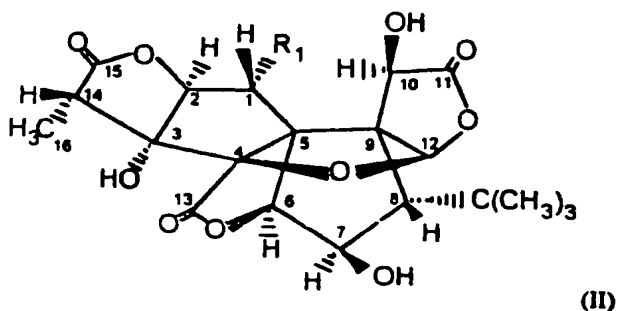
Toutefois, afin d'orienter sélectivement la réaction d'arylation au niveau de la fonction hydroxyle présente en position 7 du ginkgolide, il est au préalable nécessaire de procéder à une protection du groupement hydroxyle  
15 présent en position 10 et le cas échéant en 1, qui sont plus réactifs.

Plus précisément, la présente invention a pour second objet un procédé de préparation pour la préparation d'un composé de formule générale  
I



20

telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il met en œuvre à titre de produit de départ un composé de formule générale II



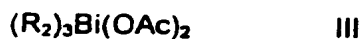
5

dans laquelle :

$R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle et comprend les étapes consistant à :

- protéger au moins une des fonctions hydroxyles présentes en position(s) 1 et/ou 10 par un groupement protecteur labile,
- transformer la fonction hydroxyle en position 7 dudit composé protégé obtenu à l'issue de l'étape 1 avec un diacétate de tris(aryl)bismuth de formule III

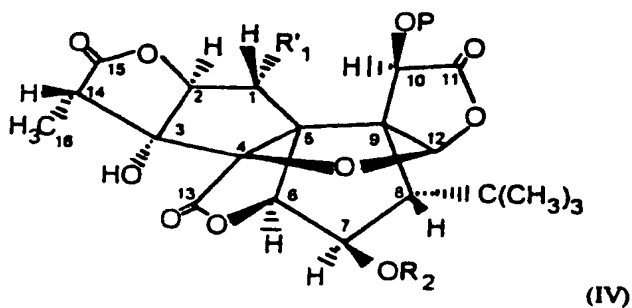
10



avec  $R_2$  tel que défini ci-dessus,

15

dans des conditions opératoires telles que l'on obtient un composé de formule générale IV



dans laquelle  $R'_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement  $\text{OP}'$  avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant

20

ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et  $R_2$  est tel que défini ci-dessus et

- éliminer le groupement protecteur de la fonction hydroxyle en position 1 et/ou 10 et
- 5                   - isoler le composé de formule générale I attendu.

En ce qui concerne la première étape de protection de la ou des fonction(s) hydroxyle(s), plusieurs méthodes et réactifs sont à la disposition de l'homme du métier pour effectuer cette réaction.

10                   A titre illustratif de ces méthodes, on peut plus particulièrement citer celle consistant à convertir au moins l'une des fonctions hydroxyle en position 1 ou 10 en un groupement alkylester. La réaction correspondante peut s'effectuer dans le diméthylformamide à une température comprise entre 15 et 50°C pendant environ 4 à 10 heures. Selon cette variante, la fonction hydroxyle  
15 est protégée sous la forme d'un ester acétyle, n-butyryle, n-valéryle et l'agent protecteur utilisé est respectivement l'anhydride acétique, n-butyrique ou n-valérique.

On peut également envisager l'éthérification d'au moins une des fonctions hydroxyles en position 1 ou 10 avec un groupement  
20 benzyloxyméthyle  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (BOM) ou un groupement tert-butyldiphénylsilyle.

Dans le cas de ce dernier composé, on met en contact le composé de formule générale II avec le chlorure de tert-butyldiphénylsilyle dans un solvant polaire de type diméthylformamide DMF. La réaction de  
25 silylation est réalisée à température ambiante et sous agitation. On récupère le composé silylé attendu par hydrolyse ménagée du milieu réactionnel puis extraction organique. Il est isolé sous une forme purifiée par chromatographie.

En ce qui concerne plus particulièrement le réactif d'arylation  
30 dérivé du bismuth de formule générale III, l'homme de l'art dispose de différents protocoles pour le préparer.



Par exemple, ce réactif peut être préparé par traitement du trichlorure de bismuth avec un réactif de Grignard ou avec un organolithium suivi de l'oxydation consécutive du dérivé triarylbismuthane ainsi obtenu. L'oxydation de  $\text{Bi}^{\text{III}}$  en  $\text{Bi}^{\text{V}}$  peut être réalisée à l'aide de chlore, brome ou de  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  pour conduire au dérivé triarylbismuthane dihalogéné. Le traitement de ce dernier avec du carbonate de sodium puis de l'acide acétique conduit alors au réactif d'arylation attendu.

Un autre mode de préparation consiste à faire réagir le dérivé triarylbismuth dihalogéné avec de l'acétate d'argent pour conduire directement au diacétate de bismuth.

Une troisième variante comprend l'oxydation in situ du dérivé triarylbismuthane en diacétate de bismuth V. Dans ce cas, on additionne 1 à 1,2 équivalents d'acide peracétique à une solution de triarylbismuthane dans un mélange dichlorométhane/tétrahydrofurane.

Toutefois, dans le cas de la présente invention, on privilégiera une variante de procédé développée récemment et consistant à oxyder des dérivés triarylbismuthanes en leurs diacétates correspondants par simple traitement avec du perborate de sodium dans de l'acide acétique. Ce protocole a pour avantage d'être réalisable à température ambiante et de nécessiter un temps réactionnel réduit. Il conduit à une grande variété de dérivés arylés dans lequel le groupe aryle est substitué par des groupements électrodonneurs et/ou électro-attracteurs (S. Combes et J.P. Finet, Synthetic Communications, 26(24), 4569-4575 (1996)).

La réaction d'arylation au niveau du dérivé ginkgolide est réalisée par mise en présence du composé de formule générale II, dont au moins l'une des fonctions hydroxyle en position 1 ou 10 est protégée par un groupement protecteur labile, et du dérivé diacétate de tris(aryl)bismuth de formule générale III dans un solvant, non polaire ou peu polaire, en présence d'une quantité catalytique efficace de cuivre, métal ou de sels de cuivre (II).

Conviennent également comme catalyseurs, les esters de cuivre (II) tels que les acylates, les sulfonates ou les halogénures.

Ce catalyseur peut être présent à une quantité comprise entre 0,01 et 0,1 équivalent.

En ce qui concerne plus particulièrement le solvant retenu pour la réaction d'arylation, il peut être choisi parmi le dichlorométhane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , le tétrahydrofuranne, THF, le diméthylformamide, DMF, et le benzène.

Les composés de formules générales II et III sont mis en présence en quantité suffisante pour conduire à la fonctionnalisation du dérivé ginkgolide en position 7. A cet effet le réactif bismuthé est de préférence introduit à raison de 1 à 7 équivalents de composé de formule générale II protégé.

La réaction est de préférence réalisée à température ambiante et sous atmosphère inerte.

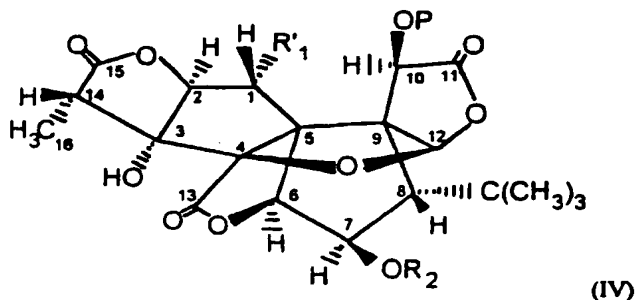
Elle peut par ailleurs s'écouler sur plusieurs jours et dure environ jusqu'à 6 jours.

15

A l'issue de la réaction, on isole le composé attendu des autres réactifs. A ses fins, on procède à une hydrolyse en milieu acide du mélange réactionnel puis à son extraction en phase organique. L'extrait organique est séché et concentré et le composé obtenu purifié par chromatographie. A l'issue de cette étape de séparation, on procède à la déprotection de la ou des fonctions hydroxyles des positions 1 et/ou 10. La méthode retenue est bien entendu fonction de la nature du groupement protecteur utilisé.

20

La présente invention se rapporte également aux composés de formule générale (IV)



25

dans laquelle  $R'_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement  $OP'$  avec  $P$  et  $P'$ , identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et  $R_2$  est tel que défini ci-dessus, à titre d'un intermédiaire de synthèse des composés de formule générale I revendiqués.

De préférence,  $R_2$  y représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en  $C_1$  à  $C_7$  linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en  $C_1$  à  $C_5$  linéaire ou ramifié ou un groupement  $(CH_2)_nOR_6$  avec  $n$  étant un entier variant de 1 à 5 et  $R_6$  représentant un groupement  $P(O)(OR_7)(OR_8)$  dans lequel  $R_7$  et  $R_8$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle  $C_1$  à  $C_7$ . Il s'agit plus préférentiellement d'un radical 4-méthylphényle.

La perfusion d'un composé selon l'invention comme le 7-O-(p)-Tolyl)-ginkgolide C au cours d'un protocole d'ischémie/reperfusion montre que ce composé induit un effet cardioprotecteur significativement supérieur à celui d'un ginkgolide B perfusé dans les mêmes conditions.

Cet effet cardioprotecteur se traduit notamment par une diminution significative du développement de la contracture ischémique et post-ischémique et d'une amélioration significative de la récupération du travail cardiaque à la reperfusion.

En conséquence, la présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins à titre de principe actif un composé de formule générale I tel que défini précédemment. Ces compositions pharmaceutiques se révèlent tout particulièrement utiles pour leurs propriétés cardioprotectrices.

Bien entendu, les compositions pharmaceutiques revendiquées peuvent comprendre en outre d'autres excipients et/ou véhicules pharmacologiquement acceptables.

Les exemples et figures présentés ci-après sont soumis à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

## Figures

Figure 1 : Représentation schématique du protocole expérimental sur le modèle de cœur de rat isolé perfusé avec a, b, c, d, e), définis comme suit :

- 5 a) phases de perfusion des ginkgolides testés
- b) période de contrôle normoxique
- c) phase d'ischémie partielle (-80% du flux)
- d) phase d'ischémie totale
- 10 e) période de reperfusion.

## EXEMPLE 1 :

### **Préparation du diacétate de tris(p-tolyl)bismuth**

#### **1) *Tris (p-tolyl)bismuthane (1)***

15 Sous argon une solution de 20 g (0,117 mol) de 4-bromotoluène dans 160 ml de THF sec sont ajoutés à une suspension de 2,86 g (0,117 mol) de magnésium en poudre dans 20 ml de THF. Le mélange est porté à reflux pendant 1 h et ensuite sonifié pendant 0,5 h. Après refroidissement à 0°C, 11,07 g (0,035 mol) de trichlorure de bismuth sont ajoutés en 30 minutes, la  
20 température étant maintenue entre 0°C et 5°C. Le mélange est alors chauffé à reflux pendant 30 minutes et agité pendant une nuit. Il est ensuite hydrolysé avec une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl 10 % saturée en NaCl. Après séparation de la phase organique, la phase aqueuse est filtrée sur Célite, puis extraite au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, les extraits organiques sont concentrés. Le  
25 produit brut est recristallisé dans un mélange chloroforme-éthanol à 15°. On récupère 8 g de **1** sous forme d'un solide blanc. Rdt 43 %, P<sub>fus.</sub>: 117°C.

#### **2) *Diacétate de tris(p-tolyl)bismuth (2)***

Un mélange de 1,86 g (18,66 mmol) de perborate de sodium  
30 monohydraté, 3 g (6,22 mmol) de tris (p-tolyl)bismuthane (**1**) dans 65 ml d'acide acétique est agité à température ambiante pendant 1 h. Le mélange réactionnel est alors versé dans 100 ml d'eau et extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 fois

50 ml). Les extraits organiques sont lavés avec de l'eau, séchés sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrés jusqu'à un faible volume auquel on ajoute 100 ml d'éther ; la solution est gardée à  $-15^\circ\text{C}$  pendant une nuit. Après filtration, le solide est recristallisé dans un mélange dichlorométhane-pentane. On récupère 2,64 g de  
5 (2) sous-forme de cristaux légèrement jaunes. Rdt. 71 % ;  $P_{\text{fus}}$  :  $172^\circ\text{C}$ .

### **EXEMPLE 2 :**

#### **Préparation du 7-O-(p-Tolyl)ginkgolide C**

10 1) 1-O-(*tert*-Butyldiphénysilyl)ginkgolide C (3)  
4,4 g (10 mmol) de ginkgolide C et 4,1 g (60 mmol) d'imidazole sont mis en solution dans 10 ml de DMF sec. On y ajoute alors 8,3 ml (30 mmol) de chlorure de *tert*-butyldiphénysilyle dans 3 ml de DMF. Après 2 jours d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est hydrolysé  
15 avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et extrait à l'acétate d'éthyle. Les extraits sont lavés une fois avec une solution saturée en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et deux fois avec une solution saturée en  $\text{NaCl}$ . Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation des solvants, le mélange brut est séparé par flash chromatographie sur silice avec un éluant AcOEt/Pentane (7:3; 6:4). On récupère ainsi 2,6 g de ginkgolide  
20 silylé (3). Rendement : 79 %,  $R_f = 0,15$  (Pentane/AcOEt, 7:3).  $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{11}\text{Si}$  (678,8).

#### **2) Réaction d'arylation du dérivé (3)**

A une solution de 0,2 g (0,295 mmol) de ginkgolide silylé (3) dans  
25 2 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sous azote, on ajoute le diacétate de tris(*p*-tolyl)bismuth (2) (1 équivalent) et le diacétate de cuivre (0,1 équivalent). Après 24 heures, un second équivalent de (2) est ajoutée. Toutes les 24 heures pendant 5 jours, 1 équivalent de (2) est rajouté.

En fin de réaction, le mélange est hydrolysé par une solution  
30 d'HCl 3N et est extrait au dichlorométhane. Les extraits sont séchés sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrés sous vide. Le mélange réactionnel est purifié par

chromatographie sur silice avec un mélange AcOEt/Pentane (2:8 ; 3:7).  $R_f$  6 = 0,24 ;

3) 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide (5)

Sous agitation, 80 mg (0,1 mmol) de composé préparé selon l'étape 2), en solution dans 1,5 ml de THF sont traités par 65 mg (0,2 mmol) de fluorure de tétrabutylammonium en solution dans 1 ml de THF. Après 2 h, le milieu réactionnel est hydrolysé par 3 ml d'une solution aqueuse saturée en NaCl et ensuite extrait à l'AcOEt (4 fois 5 ml). Les extraits sont séchés sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation, le mélange brut est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange AcOEt/Pentane (4:6 et 5:5). On récupère 40 mg (72 %) de (5).  $R_f$  = 0,35 (AcOEt/Pentane, 5:5) C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>11</sub> (530,5). Anal. Calc. : C 61,13 ; H 5,70 ; Exp. : C 61,12 ; H 5,76.

**EXEMPLE 3 :**

15 **Propriétés cardioprotectrices du 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide C**

L'effet du 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide C sur la récupération fonctionnelle cardiaque a été testé sur un modèle de cœur de rat isolé perfusé en mode isovolumique. Les cœurs ont été prélevés sur des rats mâles WISTAR (d'environ 350 g) préalablement anesthésiés, puis rapidement perfusés en mode rétrograde aortique à une pression constante de 100 cm H<sub>2</sub>O. Le milieu de perfusion est une solution de Krebs-Henseleit à 37° C (pH 7,35), qui contient 10 mM de glucose et 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Une incision dans l'artère pulmonaire permet l'écoulement de flux coronarien, et la mesure du débit coronaire en fonction du temps.

Après ablation de l'oreillette gauche, un ballonnet de latex est inséré dans le ventricule gauche, puis rempli d'eau distillée de manière à obtenir une pression diastolique de contrôle (période normoxique) comprise entre 8 et 12 mm Hg. Le ballonnet est relié à un capteur de pression, lui-même relié à un enregistreur-différentiateur (GOULD®), ce qui permet l'analyse des paramètres hémodynamiques suivants : pressions télédiastolique et développée P, fréquence cardiaque et dérivée première de la pression dP/dt.

Après une période de contrôle normoxique de 30 minutes (figure 1), les cœurs ont été soumis à une séquence d'ischémie/reperfusion constituée d'une ischémie partielle de 10 minutes, suivie d'une ischémie totale de 30 minutes et d'une reperfusion de 60 minutes. L'ensemble des paramètres hémodynamiques et le débit coronaire ont été mesurés toutes les 5 minutes au cours de ce protocole.

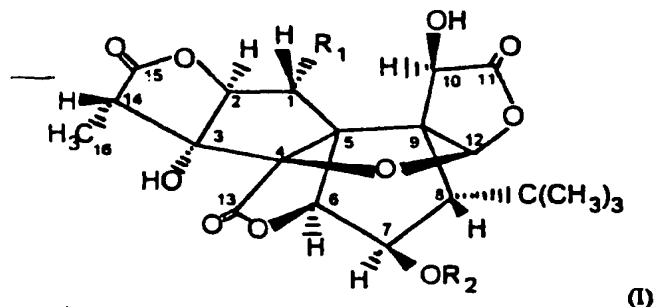
Le ginkgolide B et le 7-O-(p-Tolyl)-ginkgolide C ont été perfusés dans les mêmes conditions au cours des 10 dernières minutes de la période de contrôle, la totalité de l'ischémie partielle et le début de la reperfusion (voir phase (a) sur la figure 1), et tous deux à la concentration de 150 ng/ml. Les résultats obtenus montrent que le 7-O-(p-Tolyl)-ginkgolide C induit un effet cardioprotecteur significativement supérieur à celui du ginkgolide B. Ce comportement avantageux du ginkgolide selon l'invention se traduit en particulier par une diminution significative du développement de la contracture ischémique et post-ischémique (pression télédiastolique intraventriculaire gauche) et par une amélioration significative de la récupération du travail cardiaque à la reperfusion.

Le protocole choisi est un peu plus sévère (30 minutes d'ischémie totale au lieu de 20 minutes) que celui qui avait permis de démontrer les propriétés cardioprotectrices des ginkgolides A et B, ainsi que du Bilobalide (S. PIETRI et al., (1997), J. Mol. Cell. Cardiol. 29 ; 733-742).

De plus, des expériences en parallèle, visant à déterminer la concentration minimale de 7-O-(p-tolyl)-ginkgolide capable d'induire des dysfonctionnements cardiaques en période de contrôle préischémique ont été réalisées. A cet effet il a été perfusé des concentrations croissantes dans le myocarde normoxique. Aucun problème hémodynamique n'a été décelé jusqu'à 1 500 µg/ml. Ceci laisse supposer que des expériences de cardioprotection peuvent être effectuées en toute sécurité à ces concentrations.

## REVENDECATIONS

### 1. Composé de formule générale I



**dans laquelle :**

- $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
- $R_2$  représente un groupement aromatique en  $C_5$  à  $C_{12}$  comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :
  - atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
  - groupements hydroxyle, alkyle en  $C_1$  à  $C_7$  linéaire ou ramifié, alkoxy en  $C_1$  à  $C_7$  linéaire ou ramifié, alcényle en  $C_2$  à  $C_6$ ,
  - groupement  $(CH_2)_nX$  avec  $n$  représentant un entier compris entre 0 et 5 et  $X$  représentant un groupement choisi parmi :
    - $NR_3R_4$  avec  $R_3$  et  $R_4$  représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en  $C_1$  à  $C_7$  ou un groupement phényle,
    - les groupements  $CN$ ,  $CHO$ ,  $CF_3$ ,  $SR_5$  avec  $R_5$  représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en  $C_1$  à  $C_7$  ou un phényle et
    - un groupement  $OR_6$  avec  $R_6$  répondant à la définition de  $R_5$  ou un groupement  $P(O)(OR_7)(OR_8)$  avec  $R_7$  et  $R_8$  représentant indépendamment l'un



de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle  $C_1$  à  $C_7$ .

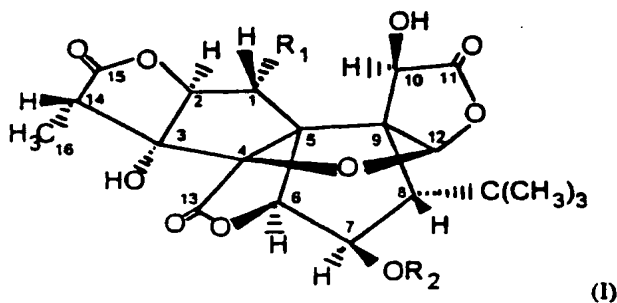
2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que  $R_2$  représente un groupement phényle, 1- ou 2- naphthyle ou biphényle, substitués conformément à la revendication 1.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que  $R_2$  représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en  $C_1$  à  $C_7$  linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en  $C_1$  à  $C_5$  linéaire ou ramifié ou un groupement  $(CH_2)_nOR_6$  avec  $n$  étant un entier variant de 1 à 5 et  $R_6$  représentant un groupement  $P(O)(OR_7)(OR_8)$  dans lequel  $R_7$  et  $R_8$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en  $C_1$  à  $C_7$ .

4. Composé selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que le groupement  $R_1$  représente un groupement hydroxyle.

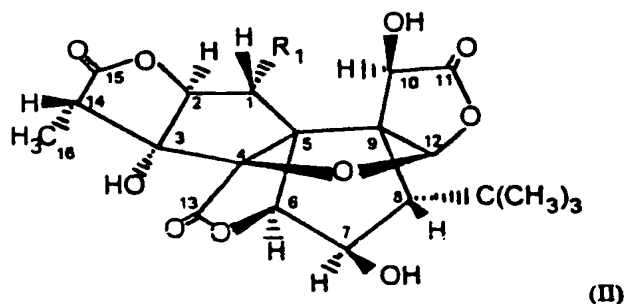
5. Composé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il s'agit du 1,3,10-trihydroxy-7-(4-méthylphénoxy) ginkgolide.

6. Procédé de préparation d'un composé de formule générale I



20

telle que définie en revendication 1 à 5, caractérisé en ce qu'il met en œuvre à titre de produit de départ un composé de formule générale II



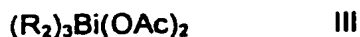
dans laquelle  $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle.

5 et comprend les étapes consistant à :

– protéger au moins une des fonctions hydroxyles en position 1 et/ou 10 par un groupement protecteur labile,

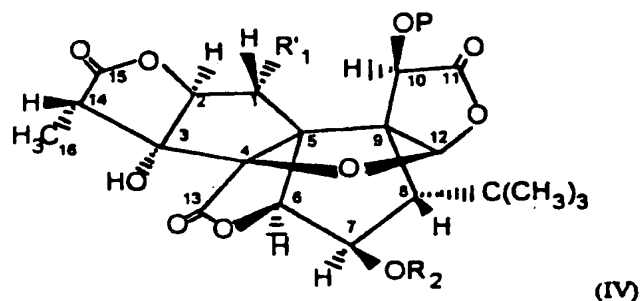
– transformer la fonction hydroxyle en position 7 du composé protégé obtenu à l'issue de l'étape 1 avec un diacétate de tris(aryl)bismuth de

10 formule III



dans laquelle  $R_2$  est tel que défini en formule générale I, dans des conditions opératoires telles que l'on obtient un composé de formule générale IV

15



dans laquelle  $R'_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupement  $\text{OP}'$  avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et  $R_2$  est tel que défini en formule générale I :

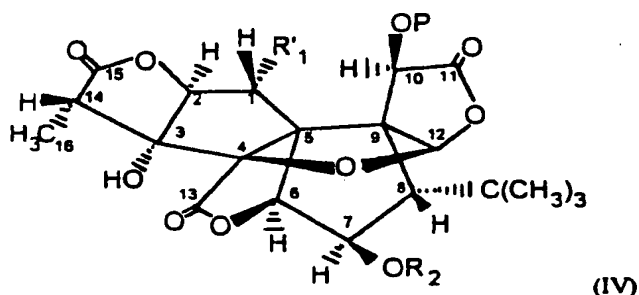
20

- éliminer le groupement protecteur de la fonction hydroxyle en position 1 et/ou 10 et
- isoler le composé de formule générale I attendu.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la  
 5 réaction du composé de formule III avec le composé de formule II dont au moins l'une des fonctions hydroxyles en position 1 ou 10 est protégée, est réalisée dans un solvant non polaire ou peu polaire en présence d'une quantité catalytique efficace de cuivre métal ou de sels de cuivre (II).

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce que le  
 10 composé de formule III est introduit à raison de 1 à 7 équivalent de composé de formule générale II protégé.

#### 9. Composé de formule générale IV



15 dans laquelle

- R'1 représente un atome d'hydrogène ou un groupement OP' avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et
- 20 - R2 représente un groupement aromatique en C5 à C12 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :

- atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- groupements hydroxyle, alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, alkoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, alcényle en C<sub>2</sub> à C<sub>6</sub>,
- groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi :
  - NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> avec R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> ou un groupement phényle,
  - les groupements CN, CHO, CF<sub>3</sub>, SR<sub>5</sub> avec R<sub>5</sub> représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> ou un phényle,
  - un groupement OR<sub>6</sub> avec R<sub>6</sub> répondant à la définition de R<sub>5</sub> ou un groupement P(O)(OR<sub>7</sub>)(OR<sub>8</sub>) avec R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub>.

à titre d'intermédiaire de synthèse des composés de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5.

10. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5.

1/1

